

Serial No. 09/838,718

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Steidler et al.

Serial No.: 09/838,718

Filed: April 19, 2001

For: USE OF A CYTOKINE-PRODUCING
LACTOCOCCUS STRAIN TO TREAT
COLITIS

Examiner: B. Whiteman, Ph.D.

Group Art Unit: 1633

Attorney Docket No.: 2676-4779US

RECEIVED

JAN 22 2003

TECH CENTER 1600/2900

DECLARATION OF LOTHAR STEIDLER

Box RCE
Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

My name is Dr. Lothar Steidler, and I declare as follows:

1. I am the first named inventor of the referenced patent application.

2. The patent application and invention relate generally to the use of recombinant gram positive bacteria for the delivery of anti-inflammatory proteins in the intestine.
3. My co-inventors and I showed this by treating or preventing experimental colitis in mice by the use of interleukin-10 producing *L. lactis* and soluble type1 TNF receptor producing *L. lactis*. Our results were published. (See, e.g., Steidler et al. (2000) *Science* 289, 1352-1355).
4. My co-inventors and I prevented the onset of enterocolitis in mice in which the IL-10 gene was disrupted. In time, this genotype leads to the development of enterocolitis (Kuhn et al. (1993) *Cell* 75, 263-274). Prognosis of inflammatory bowel disease ("IBD") in humans can be made based on an individual's genetic profile (Ogura et al. (2001) *Nature* 411, 603-606, Hugot et al. (2001) *Nature* 411, 599-603). It is therefore possible to also select patients and prevent in them the onset of IBD.
5. I am informed and believe that the referenced patent application is being rejected, for among other reasons, as providing only sufficient guidance to make and/or use a nucleic acid encoding the IL-10 protein, which was thought not to be expandable to include any cytokine.
6. After reviewing the disclosure of our invention and being otherwise apprised of the relevant scientific literature, one of skill in the art would expect that other proteins displaying anti-inflammatory properties could be used, such as the Epstein-Barr virus BCRF-I gene product, TNF antagonistic peptides, and the IL-12 p40 homodimer.
7. For instance, the Epstein-Barr virus BCRF-I gene product, also called "Viral (v)IL-10" is highly analogous to hIL-10 (Moore et al. (1990) *Science* 248, 1230-1234) and shows comparable immune suppressive activities with hIL-10: (de Waal et al. (1991) *J Exp Med* 174, 915-924, Niirio et al. (1992) *Lymphokine Cytokine Res* 11, 209-214). Also, other viral IL-10 genes have been identified and these as well showed similar biological activities (Fleming et al. (1997) *J Virol* 71, 4857-4861).

8. Further, peptides that inhibit TNF activity act by mimicking the interactive site for TNF of the TNF-receptor thereby prevent the binding of TNF to its receptor (Takasaki et al. (1997) *Nat Biotechnol* 15, 1266-1270; Chirinos-Rojas et al. (1997) *Cytokine* 9, 226-232; and Chirinos-Rojaset al. (1998) *J Immunol* 161, 5621-5626) and consequently downstream signaling.
9. Also, the IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity and thereby behaves as a potent antagonist (Ling et al. (1995) *J Immunol* 154, 116-127; Gillessen et al. (1995) *Eur J Immunol* 25, 200-206; and Germann et al. (1995) *Immunol Today* 16, 500-501).
10. World leading experts believe that our published experiments can be extrapolated to treatment of humans suffering from IBD, and, furthermore, to other diseases and also by use of other recombinant proteins. For instance, as shown by the attached correspondence, we are establishing the first clinical trials together with Professor Sander van Deventer at the Academisch Medisch Centrum (Amsterdam, The Netherlands).
11. Furthermore, as shown by the attached correspondence, Professor Richard S. Blumberg (Harvard Medical School, current Scientific Chair of the Crohn's and Colitis Foundation of America) invited us to start a clinical trial based on the data published by us in Steidler et al.
12. Professor Fergus Shanahan (University College, Cork, Ireland) states in a perspective in *Science* (Shanahan, F. (2000) *Science* 289, 1311-1312) that "if safety, efficacy, and localized delivery of bioactive drugs by genetically modified, food grade bacteria can be assured in humans, convenience of administration will definitely appeal to patients".
13. Professor Balfour Sartor states (Gordon, D. (2000) *Gastroenterology* 119, 1187-1188) "This is an exciting and novel delivery system potentially applicable to a wide variety of recombinant molecules..." Colin Michie: "...This study [*i.e.*, Steidler et al.] favourably alters our perception of potential biological therapies for common medical problems."

14. I am informed and believe that the referenced patent application is also being rejected, for among other reasons, as it was thought that one skilled in the art would not be able, without undue experimentation, to extrapolate from the *L. lactis* examples provided in the referenced application to other non-invasive Gram-positive bacteria in the method of the present invention.

15. As discussed at the examiner interview, the present invention relates to the use of a medicament comprising an amount of a cytokine- or cytokine antagonist-producing non-invasive Gram-positive bacterial strain for treating IBD. Particular Gram-positive bacterial strains for which the present invention may be used include *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus species*, such as *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* and *L. plantarum*. All of the bacterial strains listed above are non-invasive strains.

16. As discussed at the interview, I respectfully submit that the state of the art does provide sufficient guidance for one skilled in the art to make and/or use a representative number of non-invasive Gram-positive bacteria, such as those listed above, in the method of the present invention. One skilled in the art would be able, without undue experimentation, to extrapolate from the *L. lactis* examples provided by the present invention to other non-invasive Gram-positive bacteria in the method of the present invention. (*See, e.g., Shanahan, supra*). The application should provide ample guidance to a person skilled in the art regarding how to treat a subject with IBD by administering a suitable non-invasive Gram-positive bacterium as a carrier/production item for any cytokine or cytokine antagonist known to affect the prevention or treatment of IBD.

17. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that

Serial No. 09/838,718

such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

DATED this __ day of January 2003.

Respectfully submitted,

Lothar Steidler, Ph.D.



BRIGHAM AND
WOMEN'S HOSPITAL



HARVARD
MEDICAL SCHOOL

75 Francis Street
Boston, Massachusetts 02115
Tel: 617.732.6917, Fax: 617.264.5185
E-mail: rblumberg@partners.org

Richard S. Blumberg, M.D.
Chief, Gastroenterology Division
Associate Professor of Medicine
Harvard Medical School

September 30, 2002

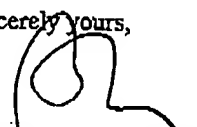
Dr. Lothar Steidler
Guest Professor
Department of Molecular Biomedical Research
VIG - Ghent University
KL Ledeganckstraat 35
B-9000 Ghent, NL

Dear Dr. Steidler

As we discussed when we met earlier in the year, I am most interested in the work described in your article, "Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10" (Science 289, pp 1352-1355). Based on the data presented therein, I would like to propose a collaboration in which physicians from the Gastroenterology Division at Brigham and Women's Hospital would test this novel technology in a clinical trial on patients suffering from Crohn's disease. We should certainly discuss several issues, such as medical-ethics and environmental safety, in greater depth and will have to acquire the necessary approvals from the appropriate authorities.

I look forward to hearing from you with great enthusiasm.

Sincerely yours,


Richard S. Blumberg, M.D.
Chief, Gastroenterology
Brigham and Women's Hospital
Associate Professor of Medicine
Harvard Medical School

RSB:jmf

h:\rsb\pro\steidler ltr

Beschikking
DGM/SAS nr. BGGO 02/01

Gelezen de aanvraag d.d. 8 januari 2002, van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam om een vergunning als bedoeld in artikel 23 van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen (Stb. 1993, 435),

De Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer,

in overeenstemming met de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport,

overwegende,

1. AANVRAAG¹

De aanvraag heeft betrekking op de klinische toepassing van *Lactococcus lactis* met daarin een recombinant humaan interleukine 10 (hIL-10) gen als ontstekingsremmer bij patiënten met een matige of ernstige vorm van de ziekte van Crohn. Het doel van de werkzaamheden is het ontwikkelen van een therapie tegen de ziekte van Crohn.

De werkzaamheden zijn voorgenomen plaats te vinden in de gemeente Amsterdam.

De aanvraag betreft een fase I studie met *L. lactis* stam MG 1363. Door middel van genetische modificatie brengt deze bacterie een humaan eiwit tot expressie, IL-10, dat een immuunonderdrukkende werking heeft bij mensen. Door de expressie van IL-10 in de darm, is deze bacterie in staat de ontstekingsreactie in de darm bij mensen met de ziekte van Crohn te verminderen.

2. PROCEDURE

De procedure is conform het bepaalde in hoofdstuk 13 van de Wet milieubeheer (Stb. 1994, 80) en het bepaalde in de Algemene wet bestuursrecht (Stb. 1998, 1), onder meer de paragrafen 3.5.2. tot en met 3.5.5., uitgevoerd.

¹Voor definities van gebruikte begrippen zie artikel 1 van de vergunning.

3. ADVIES

Op 18 maart 2002 heeft de COGEM geadviseerd (CGM/020318-18) over de aanvraag. Op basis van het COGEM advies wordt geconcludeerd dat op grond van een analyse van de mogelijke risico's er geen bezwaar bestaat tegen het uitvoeren van de in de aanvraag beschreven werkzaamheden. De vergunningverlener kan zich inhoudelijk met deze conclusie verenigen. Nadien is geen informatie ter kennis gekomen op basis waarvan deze conclusie inhoudelijk zou moeten worden gewijzigd.

4. BEOORDELINGSASPECTEN

In lijn met de internationale beginselen voor de bescherming van het milieu en de volksgezondheid wordt bij de beoordeling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen het voorzorgsbeginsel toegepast. In de in 1992 opgestelde 'Verklaring van Rio De Janeiro inzake Milieu en Ontwikkeling' is het voorzorgsbeginsel met het oog op de bescherming van het milieu als volgt beschreven:

'Teneinde het milieu te beschermen zullen staten naar hun vermogen op grote schaal de voorzorgsbenadering toepassen. Daar waar ernstige of onomkeerbare schade dreigt, dient het ontbreken van volledige wetenschappelijke zekerheid niet als argument te worden gebruikt voor het uitstellen van kosten-effectieve maatregelen om milieuaantasting te voorkomen.'

Tijdens de bespreking van de voorstellen tot wijzigingen van de Richtlijn 90/220/EEG, in de Milieuraad van juni 1999, is afgesproken dit beginsel met onmiddellijke ingang in de praktijk van de vergunningverlening expliciet aan de orde te laten komen en als uitgangspunt dat bij de beoordeling gehanteerd wordt. Voor de Nederlandse situatie betekent dit dat tijdens de risico-analyse en beoordeling in het kader van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen expliciet overwogen moet worden of de te beoordelen handelingen kunnen leiden tot ernstige dan wel onomkeerbare, aan de genetische modificatie gerelateerde, aantasting van de volksgezondheid of het milieu.

Bij de behandeling van een verzoek om een vergunning voor het uitvoeren van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen is het van belang te beoordelen welke effecten voor mens en milieu daaraan zijn gerelateerd. Een dergelijke (risico)beoordeling is gebaseerd op een analyse en beschouwing van de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme en de wijze waarop het wordt toegepast. Daarbij staan twee vragen centraal:

1. Zijn er redenen om aan te nemen dat het genetisch gemodificeerde organisme of zijn nakomelingen vanwege de genetische modificatie schadelijk zal zijn voor mens of milieu?
2. Kan het ingebrachte genetische materiaal van het genetisch gemodificeerde organisme worden overgedragen naar andere organismen, en zijn er redenen om aan te nemen dat die als een resultaat daarvan schadelijk zijn voor mens en milieu?

Deze vragen zijn niet in hun algemeenheid te beantwoorden. Daarom is in de risico-analyse en de daaropvolgende risico-beoordeling een gedetailleerde structuur aangebracht op basis van internationale wetenschappelijke consensus. Daarbij worden onder meer beschouwd:

- de relevante eigenschappen van het uitgangsgen organisme;
- de ingebrachte genetische eigenschappen;
- de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme zelf, voor zover die bekend zijn uit eerdere proefnemingen;
- de aard en effecten van de werkzaamheden met het genetisch gemodificeerde organisme;

- de beoogde locatie(s) voor de werkzaamheden.

De analyse moet daarbij opheldering geven over de aard van de eventuele ongewenste effecten op mens of milieu die worden verwacht als gevolg van de voorgenomen handelingen en een aanduiding geven van de wijze waarop die effecten zouden kunnen optreden. Daarbij gaat het, in lijn met het voorzorgsbeginsel, niet om het opstellen van een wetenschappelijke verhandeling, maar om een redelijke onderbouwing of bepaalde effecten kunnen optreden.

5. RISICO-ANALYSE EN -BEOORDELING

Een vergunning voor het uitvoeren van klinische proeven met genetisch gemodificeerde organismen kan, voor zover het het toetsingskader van de Wet milieugevaarlijke stoffen betreft, worden verleend indien het belang van de bescherming van mens en milieu zich daartegen niet verzet. De vraag of er aan de behandeling risico's verbonden zijn voor mens en milieu wordt beantwoord in een risico-analyse van de voorgenomen werkzaamheden. Deze risico-analyse baseert zich op een beschouwing van de eigenschappen van het genetisch gemodificeerde organisme, dat wordt gebruikt voor de klinische proeven, en de omstandigheden waaronder de behandeling plaatsvindt. De risico-analyse wordt onderbouwd met gegevens die worden verstrekt door de aanvrager. De aanvrager beantwoordt daartoe de vragen die zijn opgenomen in het aanvraagformulier voor een vergunning; hij kan daarbij aangeven dat bepaalde vragen voor het betreffende geval niet van toepassing zijn.

Bij de beoordeling worden naast de gegevens in de aanvraag ook andere, voor de concrete toepassing relevante gegevens in aanmerking genomen, zoals adviezen van de COGEM.

Bij de beoordeling van de onderhavige aanvraag zijn in de risico-analyse de volgende specifieke aspecten in overweging genomen:

1. De achtergrond van de studie;
 2. De toepassing van *L. lactis* als agens in de behandeling van de ziekte van Crohn;
 3. De vervaardiging en productie van de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam;
 4. De omstandigheden waaronder de fase I klinische studie wordt uitgevoerd;
 5. Conclusie van de risico-analyse en daaruit voortvloeiende maatregelen voor risico-management.
- Op deze aspecten wordt hieronder nader ingegaan.

1. De achtergrond van de studie

Het doel van het onderzoek is om de effectiviteit en veiligheid te beoordelen van het gebruik van een bacteriestam *L. lactis* MG 1363 die een humaan IL-10 tot expressie brengt bij patiënten met matige tot ernstige verschijnselen van de ziekte van Crohn. Een symptoom van deze ziekte is een chronische ontsteking van de darm. De oorzaak van deze chronische ontsteking is onbekend. Wel is duidelijk dat de ontsteking gepaard gaat met een verstoring van evenwichten in het immuunsysteem; er wordt verondersteld dat deze verstoring kan worden opgeheven door toediening van de factor IL-10, die het immuunsysteem beïnvloedt. De therapie die in deze studie wordt onderzocht, is erop gericht om de chronische ontstekingsreactie in de dikke darm, veroorzaakt door de ziekte van Crohn, te remmen door orale toediening van een stam van de bacterie *L. lactis* die IL-10 produceert.

De behandeling zal bestaan uit de volgende stappen:

- orale toediening van *L. lactis* MG1363, in een capsulevorm, aan patiënten;
- vrijkomen van de MG 1363 in de darm;
- productie van hIL-10 door MG 1363 in de darm;
- herstel van evenwicht in het immuunsysteem door de IL-10 productie, waardoor de ontstekingsreactie in de darm wordt verminderd.

2. De toepassing van *L. lactis* als middel in de behandeling tegen de ziekte van Crohn

L. lactis is een melkzuur bacterie die van oudsher wordt gebruikt bij de bereiding van zuivelproducten, zoals kaas. De bacterie is een niet-ziekteverwekkende bacterie die volkomen veilig worden geacht voor gebruik in voeding. *L. lactis* groeit in melkproducten en gebruikt daarbij lactose (melksuiker) als energiebron, waarbij melkzuur ontstaat. *L. lactis* verkrijgt aminozuren die nodig zijn voor de vorming van zijn eigen eiwitten door de afbraak van het melkeiwit caseïne. De bacterie is sterk aangepast aan zijn niche (melk en melkproducten), en overleeft niet of slechts enkele dagen in andere niches, zoals de darm. *L. lactis* is volgens de aanvrager dan ook niet in staat de darm te koloniseren, hiervoor wordt echter geen experimentele onderbouwing gegeven. Na humane inname van *L. lactis* bacteriën (bijvoorbeeld door het eten van zuivelproducten) verlaten de bacteriën het lichaam via feces en zullen daarbij volgens de aanvrager binnen 3 dagen uit het lichaam verdwenen zijn, met de normale fecesstroom.

De in de studie gebruikte *L. lactis* stam MG 1363 is nog verder ingeperkt dan de niet-gemodificeerde ouderstam doordat hij door protoplastering vrij is gemaakt van plasmieden. Hierdoor heeft de stam het vermogen verloren om lactose en caseïne af te breken en is om deze reden niet meer goed aangepast aan zijn oorspronkelijke niche (melk). MG 1363 is nog verder biologisch ingeperkt doordat het gen dat codeert voor thymidilaat synthase (*thyA*) als gevolg van de genetische modificatie is geïnactiveerd. Hierdoor is de *L. lactis* stam voor groei afhankelijk van toevoeging van thymidine. De kans dat MG 1363 stam onder bepaalde condities zijn plasmieden herwint of dat het een actief *thyA* gen verkrijgt, is verwaarloosbaar klein. Zelfs in het geval het bovenstaande zou plaatsvinden, wordt hiermee de niet-pathogene ouderstam *L. lactis* herkrege, die veilig is voor mens en milieu.

MG 1363 zal oraal worden toegediend aan patiënten met de ziekte van Crohn. De bacteriën bevinden zich hierbij in een capsule, die zijn weg vindt naar de darm en daar in het laatste deel van de dunne darm uit elkaar valt, waarna de bacteriën de dikke darm bereiken. Hierbij komen de bacteriën vrij uit de capsule, en zullen zij ter plekke IL-10 gaan produceren. De capsule bevat een geringe hoeveelheid thymidine als voedingssupplement. Dit is nodig om de activiteit van de bacterie gedurende het verblijf in de darm te verhogen. Men verwacht dat daardoor de uitscheiding van IL-10 op een zodanig niveau wordt gebracht dat het gewenste effect, i.e. remming van de ontsteking, bewerkstelligd kan worden. Het is niet bekend of de IL-10 naast een ontstekingsremmende werking, ook nog andere effecten kan vertonen.

3. De vervaardiging en productie van de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam

De te gebruiken genetisch gemodificeerde stam MG 1363 is oorspronkelijk afgeleid van een natuurlijke *L. lactis* stam, door deze stam vrij te maken van plasmieden waarop de genetische informatie gelegen is voor lactose en caseïne afbraak. Daarna is in de stam het *thyA* gen vervangen door het gen dat codeert voor humane IL-10 door middel van twee opeenvolgende homologe recombinaties. Kloons van deze stam worden opgekweekt onder Good Manufacturing Practice (GMP). Daarna worden de genetisch gemodificeerde bacteriën gevriesdroogd en als poeder in capsules verwerkt tot een concentratie van 10^{12} kolonie vormende eenheden per capsule.

4. De omstandigheden waaronder de gentherapie wordt uitgevoerd

De aanvraag betreft orale toediening van de IL-10 producerende *L. lactis* stam MG 1363. Gedurende de studie worden bij 12 patiënten dagelijks vier capsules met MG 1363 toegediend, gedurende 7 opeenvolgende dagen. De aanvraag geeft aan dat gedurende de behandeling de patiënten in het ziekenhuis worden opgenomen, om mogelijke bijwerkingen van het toegediende preparaat te controleren. De aanvrager meent dat het eventueel mogelijk is om feces van de patiënten te inactiveren,

5

zowel tijdens het verblijf in het ziekenhuis, als na het ontslag van de patiënten.

f)

f)

5. Conclusie van de risico-analyse en daaruit voortvloeiende maatregelen voor risico-management

De risico-analyse spitst zich toe op de gevolgen die kunnen voortkomen uit een mogelijke verspreiding van MG 1363 in het milieu en een eventuele infectie met MG 1363 bij mensen in de omgeving van de patiënt, tengevolge van het vrijkomen van de bacteriestam uit de patiënt na orale toepassing. De genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam MG 1363 wordt toegediend aan patiënten met matige tot ernstige vorm van de ziekte van Crohn. De bacteriën komen vrij in de darm na het oplossen van de capsule waarin zij worden toegediend.

In studies met muizen met chronische darmontsteking werd aangetoond dat toediening van genetisch gemodificeerde *L. lactis* bacteriën die muizen IL-10 (mIL-10) tot expressie brengen, leidt tot mIL-10 expressie in de darm. De bacteriën konden ook in de darm worden gedetecteerd. Aangetoond werd dat toediening gedurende 7 uur van 3×10^9 bacteriën per uur kon leiden tot aanwezigheid van $2,8 \times 10^7$ tot $8,4 \times 10^8$ kolonie-vormende hoeveelheden genetisch gemodificeerde *L. lactis* bacteriën in het darmstelsel. In deze studie werd echter niet gecontroleerd of er ook levende *L. lactis* bacteriën in de feces van de muizen aanwezig waren. Er zijn ook geen experimentele gegevens aangeleverd door de aanvrager over mogelijke uitscheiding van de bacterie in feces na toediening van *L. lactis* aan andere zoogdieren. Omdat *L. lactis* verondersteld wordt niet in staat te zijn de darm te koloniseren, gaat de aanvrager ervan uit dat de genetisch gemodificeerde bacterie binnen drie dagen met de normale fecesstroom uit de darm worden verwijderd.

Na eventuele verspreiding van stam MG 1363 in het milieu wordt verwacht dat de stam slechts korte tijd zal overleven. De stam bezit een deletie in het *thyA* gen, waardoor de stam niet kan groeien zonder een toegevoegde bron van thymidine. Het is onwaarschijnlijk dat de concentratie van thymidine die in het milieu voorkomt voldoende hoog is voor deze bacteriestam om zich kunnen handhaven in het milieu. Op grond van de functie van menselijk IL-10 (hIL-10) als cytokine (hormoon-achtige factor zonder functie in een micro-organismen) is er geen reden om aan te nemen dat dit eiwit op enige wijze kan interfereren met de groei van de bacterie, of met de thymidine-afhankelijkheid van de stam. De kans op verspreiding van de bacteriestam MG 1363 in het milieu lijkt daarmee voldoende beperkt.

Het is echter niet duidelijk of de expressie van het hIL-10 zou kunnen leiden tot pathogene effecten indien de bacterie aanwezig is in de darm van gezonde personen (of dieren). Het ingebrachte hIL-10 gen in stam MG 1363 is niet geassocieerd met negatieve effecten zoals bacteriële virulentie, toxiciteit of antibioticum resistentie.

Uit de bovenstaande overwegingen volgt dat het aannemelijk is dat de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam MG 1363 door zijn behoefte aan toegevoegd thymidine en de andere biologische inperkingen die deze stam bezit, zich niet kan handhaven in het milieu en daarmee mensen in de omgeving van de patiënt zou kunnen besmetten. Omdat niet bekend is of hIL-10 naast een ontstekingremmende werking ook nog andere effecten kan vertonen, is het echter niet in voldoende mate uitgesloten dat stam MG 1363 door de expressie van het hIL-10 mogelijk nadelige effecten zou induceren na een eventuele besmetting van derden.

Daarom is in artikel 4, onder b, als voorwaarde opgenomen dat feces van patiënten op afdoende wijze ontsmet dienen te worden, zolang niet is aangetoond dat de feces vrij zijn van *L. lactis*. De aanwezigheid van *L. lactis* in fecesmonsters van patiënten moet na afloop van de behandeling gedurende minimaal 3 dagen gem. nitord worden met behulp van een gevalideerde detectiemethode.

Het specifiek aantonen van de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam stuit op moeilijkheden, omdat het

genetisch gemodificeerde micro-organisme geen direct selecteerbare kenmerken heeft op grond waarvan het kan worden onderscheiden van een niet-gemodificeerde *L. lactis* stam. De aanvrager beschrijft een methode op basis van een FACS (fluorescence activated cell sorter) analyse waarmee levensvatbare *L. lactis* kan worden aangetoond, op basis van een specifiek antilichaam gericht tegen *L. lactis* bacteriën en een fluorescerende probe die zich hecht aan levensvatbare bacteriën. Deze methode is niet specifiek voor de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam MG 1363, maar toont alle levensvatbare *L. lactis* bacteriën aan. Om bruikbaar te kunnen zijn moet de gevoeligheid van de methode tenminste vergelijkbaar zijn met de gevoeligheid van aantoningsmethoden voor darmpathogenen zoals *Salmonella typhimurium*, i.e. de methode moet een positief resultaat geven bij aanwezigheid van 10^3 levensvatbare bacteriën per gram feces. Hoewel de door de aanvrager beschreven methode alle levensvatbare *L. lactis* aantoot, is hij onder omstandigheden ook bruikbaar voor de monitoring van de aanwezigheid van genetisch gemodificeerde *L. lactis* bij patiënten; aanwezigheid van niet-gemodificeerde *L. lactis* in een fecesmonster leidt immers slechts tot een overschatting van het aantal *L. lactis* bacteriën. Gezien de vraag om aan te tonen hoe lang de genetisch gemodificeerde *L. lactis* in de darm aanwezig blijft, verdient het vanzelfsprekend aanbeveling dat de patiënten gedurende de periode van de behandeling en monitoring geen voedingsproducten tot zich nemen die bereid zijn met gebruik van *L. lactis* bacteriën; deze voorwaarde is, ondanks het vanzelfsprekende karakter, in artikel 4 van de vergunning als voorwaarde opgenomen.

De in de aanvraag beschreven FACS methode is, indien gevalideerd, bruikbaar voor de in artikel 4 vereiste monitoring. Indien in drie opeenvolgende fecesmonsters geen *L. lactis* gedetecteerd wordt, mag het fecesafval van de patiënten als niet-besmet afval worden behandeld. Indien uit de monitoring blijkt dat drie dagen na afloop van de behandeling, of op een later moment waarop het wenselijk wordt geacht om de monitoringsperiode te beëindigen, nog detecteerbare hoeveelheden *L. lactis* in de monsters aanwezig zijn, dient de aanvrager met behulp van een efficiënte methode de in de darm aanwezige levende bacteriën af te doden. De aanvrager geeft bijvoorbeeld aan dat de patiënten hiertoe op afdoende wijze met antibiotica behandeld kunnen worden.

In artikel 4 is tevens een voorschrift opgenomen dat bij de vervaardiging van de batches van *L. lactis* die voor de behandeling worden gebruikt, de regels van GMP worden gehanteerd, dit om de identiteit van de toegediende ggo's voldoende te kunnen garanderen.

Conclusie

Gesteld kan worden dat het belang van de bescherming van mens en milieu zich niet verzet tegen de uitvoering van een studie die wordt uitgevoerd zoals beschreven in de aanvraag waarbij de hierboven genoemde maatregelen van risicobeheersing zoals opgenomen in artikel 4 van de vergunning in acht worden genomen.

6. COMMENTAREN EN BEDENKINGEN NAAR AANLEIDING VAN DE KENNISGEVING VAN AANVRAAG EN ONTWERPBESCHIKKING

Naar aanleiding van de aanvraag en de ontwerpbeschikking zijn geen commentaren en bedenkingen ingebracht

Naar aanleiding van deze overwegingen, gelet op het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen (Stb. 1993, 435) alsmede op de Wet milieubeheer (Stb. 1994, 80),

BESLUIT:

- I Aan het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam een vergunning te verlenen als bedoeld in artikel 23 van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen (Stb. 1993, 435).
- II Aan vergunning, waarvan de op 8 januari 2002 ingediende aanvraag en de daarbij behorende stukken deel uitmaken, worden de hierna volgende voorschriften verbonden:

Artikel 1. Definities en begrippen

In deze vergunning wordt, voor zover van toepassing, verstaan onder:

- a. het Besluit: het Besluit genetisch gemodificeerde organismen Wet milieugevaarlijke stoffen (Stb. 1993, 435);
- b. COGEM: de commissie genetische modificatie, ingesteld bij de Wet milieubeheer (Stb. 1994, 80);
- c. de Minister: de Minister van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, p.a. Directie Stoffen, Afvalstoffen, Straling, ic 655, Postbus 30945, 2500 GX Den Haag, in overeenstemming met de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport;
- d. Serious Adverse Event (SAE): elk ongewenst medisch voorval dat ongeacht welke dosis de dood tot gevolg heeft; levensbedreigend is; ziekenhuisopname of verlenging van opname noodzakelijk maakt; tot blijvende of ernstige invaliditeit of arbeidsongeschiktheid leidt of kan leiden; of tot een aangeboren afwijking leidt of kan leiden.

Artikel 2. Toegestane werkzaamheden

1. De onderhavige vergunning heeft uitsluitend betrekking op de in de aanvraag beschreven werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde *L. lactis* stam, MG 1363, in de gemeente Amsterdam.
2. De in het eerste lid bedoelde werkzaamheden mogen uitsluitend doorgang vinden in overeenstemming met een klinisch protocol als bedoeld in artikel 4, voor zover de Minister dat protocol heeft goedgekeurd.
3. Een goedkeuring als bedoeld in het tweede lid wordt geacht te zijn gegeven, indien de Minister niet binnen zes weken na datum van aangetekende verzending van het klinisch protocol genoemd in het tweede lid zijn onthouding van goedkeuring aan de vergunninghouder heeft gezonden.

Artikel 3. Algemene voorschriften

1. De vergunninghouder dient tijdens de uitvoering van de werkzaamheden als bedoeld in artikel 2 zich te verzekeren van de volledige zeggenschap over de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen. Daartoe moet in het logboek als bedoeld in artikel 6, eerste lid, zijn vastgelegd op welke wijze de zeggenschap wordt gegarandeerd.
2. Medewerkers die werkzaamheden uitvoeren als bedoeld in artikel 2 moeten voor wat betreft de uitvoering van deze werkzaamheden op de hoogte zijn van de bepalingen in deze vergunning en de invulling daarvan; hiertoe dient een instructie te worden opgesteld die aan alle medewerkers ter beschikking wordt gesteld en bij het logboek als bedoeld in artikel 6, eerste lid, wordt gevoegd.
3. De vergunninghouder meldt de behandeling van iedere nieuwe patiënt vooraf aan de Minister.
4. De vergunninghouder is gehouden de conform een klinisch protocol te behandelen patiënten, en bij minderjarige patiënten hun wettelijke vertegenwoordigers, schriftelijk te laten verklaren:
 - geen bloed voor transfusiedoeleinden af te zullen staan;
 - bij voorgenomen afstaan van organen voor transplantatiedoeleinden, de bij de transplantatie betrokken artsen op de hoogte te brengen van de toegepaste therapie.
5. De vergunninghouder dient iedere wijziging in de gegevens zoals die met betrekking tot de vergunningaanvraag zijn verstrekt, onverwijld schriftelijk aan de Minister te melden.

Artikel 4. Voorschriften met betrekking tot het klinisch protocol

In een protocol als bedoeld in artikel 2, tweede lid, moet in ieder geval zijn vastgelegd dat bij de uitvoering van de behandeling aan de volgende voorwaarden wordt voldaan:

- a. De voor de klinische toepassing te gebruiken batches dienen te worden vervaardigd met inachtnaam van de regels van Good Manufacturing Practice;
- b. Na afloop van de behandeling dienen fecesmonsters van patiënten te worden gemonitord op aanwezigheid van *L. lactis* bacteriën gedurende tenminste drie dagen. Indien na drie dagen nog levensvatbare *L. lactis* wordt aangetoond moet de monitoring worden vervolgd. De monitoring dient te worden voortgezet totdat in drie opeenvolgende feces monsters, genomen over een periode van minimaal 24 uur, geen *L. lactis* bacteriën worden aangetoond. Gedurende de periode van de behandeling en de daarop volgende monitoring moeten patiënten geen voedingsproducten tot zich nemen die bereid zijn met gebruik van *L. lactis* bacteriën.
- c. Feces van de patiënten moeten worden geïnactiveerd gedurende de behandeling, en gedurende een periode van drie dagen na de behandeling. Indien drie dagen na afloop van de behandeling bij de monitoring omschreven in lid b nog levensvatbare *L. lactis* bacteriën worden aangetoond in fecesmonsters, dient de monitoring te worden voortgezet totdat in drie opeenvolgende feces monsters, genomen over een periode van minimaal 24 uur, geen *L. lactis* bacteriën worden aangetoond. Gedurende ziekenhuisopname dienen feces geïnactiveerd te worden. Feces van patiënten die niet in het ziekenhuis verblijven moeten worden opgevangen en geïnactiveerd met behulp van een chemisch toilet. In het geval dat patiënten langer dan drie dagen na afloop van de laatste toediening van *L. lactis* nog steeds *L. lactis* bacteriën in de feces uitscheiden, moet de aanvrager efficiënte maatregelen nemen om de in de darm van de patiënt aanwezige levensvatbare *L. lactis* af te doden. Deze maatregelen dienen beschreven te worden in het klinisch protocol als bedoeld in artikel 2, tweede lid.
- d. Indien, overeenkomstig lid b, controle verplicht is dan moeten de fecesmonsters als bedoeld onder b worden onderzocht op de aanwezigheid van *L. lactis* MG 1363 bacteriën met behulp van een gevalideerde methode waarbij levensvatbare *L. lactis* bacteriën worden aangetoond. Met de gebruikte methode moet 10^3 levensvatbare *L. lactis* per gram feces aangetoond kunnen worden.

Artikel 5. Voorschriften met betrekking tot controle

Gedurende het uitvoeren van de in artikel 2, eerste lid, bedoelde werkzaamheden moet regelmatig en doelmatig worden gecontroleerd op:

- a. de omstandigheden waaronder die werkzaamheden worden uitgevoerd, daaronder begrepen het optreden van complicaties;
- b. de resultaten van die werkzaamheden;
- c. afwijkingen ten opzichte van de in de klinische protocollen omschreven beoogde effecten van die werkzaamheden.

Artikel 6. Voorschriften met betrekking tot meldingen en verslaglegging

1. De vergunninghouder is verplicht van de voortgang van de werkzaamheden als bedoeld in artikel 2, eerste lid, doelmatig en frequent een logboek bij te houden, in ieder geval inhoudende een verslag van de resultaten van de in artikel 5 bedoelde controle. In het logboek moet met betrekking tot de niet in dienst zijnde medewerkers zijn aangegeven hoe de vergunninghouder zich verzekert van de volledige zeggenschap over de werkzaamheden zoals bedoeld in artikel 2.
2. De vergunninghouder is verplicht een logboek als bedoeld in het eerste lid ter beschikking te houden voor toezichthoudende ambtenaren.
3. De vergunninghouder is verplicht, gedurende de periode waarin overeenkomstig de goedgekeurde klinische protocollen controle plaatsvindt, jaarlijks een verslag van de voortgang van de werkzaamheden als bedoeld in het eerste lid, voor het eind van het kalenderjaar waarin die handelingen hebben plaatsgevonden, aangetekend te zenden aan de Minister.
4. Ieder 'serious adverse event (SAE)' dient onverwijld schriftelijk gemeld te worden aan de Minister.
5. Meldingen en verslagen die aan de Minister worden gezonden dienen geen vertrouwelijke gegevens over patiënten te bevatten.

Artikel 7. Nadere eisen

De vergunninghouder dient te voldoen aan de door de Minister te stellen nadere eisen als bedoeld in artikel 26, vierde lid, van de Wet milieugevaarlijke stoffen, betreffende de voorschriften bedoeld in de voorgaande artikelen.

Den Haag,

De Minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer,

J.P. Pronk